



(12) **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(43) Veröffentlichungstag:  
**14.02.2001 Patentblatt 2001/07**

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: **G01N 27/447**

(21) Anmeldenummer: **00116757.6**

(22) Anmeldetag: **03.08.2000**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU**  
**MC NL PT SE**  
Benannte Erstreckungsstaaten:  
**AL LT LV MK RO SI**

(30) Priorität: **11.08.1999 DE 19938002**

(71) Anmelder:  
**Studiengesellschaft Kohle mbH**  
**45470 Mülheim an der Ruhr (DE)**

(72) Erfinder:  
• **Belder, Detlev, Dr.**  
**45470 Mülheim/Ruhr (DE)**  
• **Husmann, Heribert**  
**45470 Mülheim/Ruhr (DE)**

(74) Vertreter:  
**von Kreisler, Alek, Dipl.-Chem. et al**  
**Patentanwälte,**  
**von Kreisler-Selting-Werner,**  
**Bahnhofsvorplatz 1 (Deichmannhaus)**  
**50667 Köln (DE)**

(54) **Beschichtung mit quervernetzten hydrophilen Polymeren**

(57) Gegenstand der Erfindung sind ein Verfahren zur permanenten Beschichtung der inneren Oberfläche von Säulen, Kapillaren und Mikrokanalsystemen mit hydroxylierten Polymeren, wie z.B. Polyvinylalkohol, sowie die so hergestellten Säulen, Kapillaren und Mikrokanalsysteme und deren Anwendung in der Kapillarelektrophorese und für andere Techniken unter Verwendung mikrofluidischer Systeme.

## Beschreibung

**[0001]** Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur permanenten Beschichtung der inneren Oberfläche von Säulen, Kapillaren und Mikrokanalsystemen mit hydroxylierten Polymeren. Die Innenbeschichtung erfolgt durch Behandlung der zu belegenden Oberfläche mit der Lösung eines quervernetzenden Reagens und der Lösung des Polymeren, was zu einer Immobilisierung des Polymeren an der Kapillaroberfläche führt. Das beschriebene Verfahren ist besonders geeignet zur Beschichtung von fused-silica (FS) Kapillaren und Systemen mit mikrofluidischen Strukturen für die Kapillarelektrophorese mit einem stark hydrophilen Polymer wie Polyvinylalkohol. Weiterer Gegenstand der Erfindung sind die so hergestellten Säulen und Kapillaren, sowie deren Anwendung in der Kapillarelektrophorese und verwandten Techniken.

## Hintergrund

**[0002]** Mit Methoden der Kapillarelektrophorese (CE) können Trennungen von Gemischen unterschiedlicher Verbindungen durch differentielle Migration der Analyten in einem elektrischen Feld erhalten werden. Die Trennungen werden in der Regel in Kapillaren aus fused-silica, dies ist hochreines Quarzglas, die mit einem zumeist wäßrigen Elektrolyten gefüllt sind, durchgeführt. Die inneren Oberflächen derartiger Kapillaren haben folgende Eigenschaften in ihrer Anwendung in der Kapillarelektrophorese:

- Aufgrund der aziden Silanolgruppen des FS-Materials ist ein vom pH-Wert des Elektrolyten abhängiger elektroosmotischer Fluß (EOF) in Richtung zur Kathode wirksam. Der Betrag des EOF kann in unbelegten FS-Kapillaren jedoch stark schwanken und verschlechtert dadurch maßgeblich die Präzision und Reproduzierbarkeit von Analysen in der Kapillarelektrophorese.
- Die FS-Oberflächen verhalten sich sehr adsorptiv gegenüber vielen Verbindungen. Insbesondere basische Verbindungen und große Biopolymere, wie Proteine werden aus wäßrigen Lösungen stark adsorbiert. Dies verschlechtert die Qualität und Auflösung einer kapillarelektrophoretischen Trennung solcher Verbindungen erheblich bzw. kann diese sogar unmöglich werden lassen.

**[0003]** Die Eigenschaften solcher Kapillaren können gezielt verändert werden, wenn die Kapillaroberfläche mit einer geeigneten Beschichtung versehen wird. Beschichtete FS-Kapillaren werden in der Kapillarelektrophorese aus folgenden Gründen eingesetzt:

- Zur Manipulation des elektroosmotischen Flusses: Durch Beschichtung der Oberfläche kann sowohl der Betrag, als auch die Richtung des EOF verän-

dert werden. Dadurch kann eine CE-Trennung bezüglich Auflösung und Analysenzeit optimiert werden. Die Konstanz des EOF ist in beschichteten Kapillaren zumeist größer als in unbehandelten FS-Kapillaren mit der Folge verbesserter Reproduzierbarkeit und Wiederholbarkeit von CE-Analysen.

- Zur Unterdrückung der Wechselwirkungen zwischen Analyt und Wand werden Beschichtungen eingesetzt, die gegenüber den zu untersuchenden Verbindungen eine geringe Adsorptivität aufweisen. Dadurch werden höhere Trenneffizienzen adsorptiver Verbindungen, wie z.B. Proteine, und damit eine bessere Auflösung in kapillarelektrophoretischen Trennungen erreicht.

**[0004]** Eine geeignete innere Beschichtung von Kapillaren für die CE sollte folgende Eigenschaften besitzen: i) einen konstanten EOF über einen weiten pH-Bereich, ii) Langzeitstabilität gegenüber unterschiedlichen Elektrolyten, iii) die Adsorptivität der Beschichtung gegenüber einer Vielfalt von Analyten sollte möglichst gering sein.

**[0005]** FS-Kapillaren lassen sich sehr leicht mit kationischen Polymeren wie Polybren® oder Polyvinylamin [M. Chiari, L. Ceriotti, G. Crini, und M. Morcellet; J. Chromatogr. A 836 (1999) 81] belegen, da diese stark an den entgegengesetzt geladenen FS-Oberflächen adsorbiert werden. Diese Kapillaren sind, wegen des umgekehrten, anodischen EOF, besonders zur beschleunigten Analyse sehr mobiler Anionen geeignet.

**[0006]** Die Verwendung von hydrophilen nicht-ionischen Kapillarenbeschichtungen wie Polyacrylamid- oder Polyethylenglykol-Coatings hat sich in der Kapillarelektrophorese als besonders geeignet erwiesen, da diese Beschichtungen sowohl den EOF deutlich reduzieren, als auch die Adsorption von basischen Verbindungen und insbesondere von Proteinen an der Kapillarwand unterdrücken. Es wurden verschiedene Verfahren entwickelt, um hydrophile Moleküle, zumeist nach vorhergehender Silanisierung, chemisch an die FS-Kapillaroberfläche zu binden (S. Hjerten; J. Chromatogr. 347 (1985) 191; G.M. Bruin, J.P. Chang; R.H. Kuhlmann, K. Zegers, J.C. Kraak und H. Poppe; J. Chromatogr. 471 (1989) 429; K.A. Cobb, V. Dolnik und M. Novotny; Anal. Chem. 62 (1990) 2478; A. Malik, Z. Zhao und M.L. Lee; J. Microcol. Sep. 5, (1993) 119).

**[0007]** Unter allen in der Literatur beschriebenen Kapillarenbeschichtungen haben sich diejenigen auf Polyvinylalkohol (PVA)-Basis, welches als das hydrophilste Polymer anzusehen ist, als besonders leistungsfähig erwiesen. In Kapillaren, die mit PVA beschichtet wurden, konnten insbesondere für Proteine außerordentlich hohe Trenneffizienzen erzielt werden. Zudem ist der elektroosmotische Fluß über einen weiten pH-Bereich unterdrückt und sehr stabil (M. Gilges, H. Kleemiß und G. Schomburg; Anal. Chem. 66 (1994) 2038).

## Stand der Technik

[0008] Die Herstellung von mit Polyvinylalkohol beschichteten Kapillaren ist mit herkömmlichen Verfahren relativ schwierig durchzuführen. Dies ist in den besonderen Eigenschaften des Polyvinylalkohols begründet: i) Polyvinylalkohol ist nur in Wasser löslich, daher sind klassische chemische Reaktionen in organischen Lösungsmitteln zur Fixierung des Polymers an die Kapillaroberfläche, wie z.B. durch Silanisierung, nicht möglich. ii) Wäßrige Lösungen von Polyvinylalkohol benetzen wegen ihrer starken Hydrophilie die fused-silica Kapillaren nur schlecht; daher ist es schwierig, allein durch Adsorption, homogene Filme von Polyvinylalkohol auf den Kapillaroberflächen zu erzeugen. Bisher sind folgende Verfahren beschrieben worden, um PVA-beschichtete Kapillaren zu erzeugen:

1) Gilges und Schomburg (M. Gilges, H. Kleemiß und G. Schomburg; Anal. Chem. 66 (1994) 2038; DE 42 30 403 A1) haben durch Adsorption von Polyvinylalkohol aus einer wäßrigen Lösung an die fused-silica Oberfläche einen PVA-Film auf die Kapillarwand aufgebracht. Dazu wurde eine mit der PVA-Lösung gefüllte Kapillare sehr langsam im Stickstoffstrom mittels Überdruck entleert. Nur durch vorsichtige und sehr langsame Entleerung konnte trotz der schlechten Benetzung der Oberfläche mit der Polymerlösung ein homogener Polymerfilm auf der Oberfläche erzeugt werden. In der Originalpublikation (Anal. Chem. 66 (1994) 2038) wurde zur kontrollierten Entleerung eine Drosselkapillare an die zu belegende Kapillare angekoppelt.

Die Immobilisierung des zunächst wasserlöslichen Polymerfilms wurde dann durch Erhitzen im Gasstrom realisiert. Dadurch wird Polyvinylalkohol in einen pseudokristallinen Zustand überführt und damit wasserunlöslich.

Mit diesem Verfahren konnten ohne aufwendige mehrstufige chemische Reaktionen stabile Polyvinylalkohol-Beschichtungen auf die Kapillaren aufgebracht werden. Da bei diesem Verfahren der Polymerfilm aber aus einer Polymerlösung aufgebracht wird, welche die FS-Wand nur sehr schlecht benetzt, ist dieser Teil des Verfahrens sehr fehleranfällig.

2) Shieh (US 5,605,613) konnte PVA-beschichtete Kapillaren in einem mehrstufigen Prozeß herstellen. Dazu wurde zunächst eine hydrophobe Zwischenschicht über Si-O-Si-Bindungen an die FS-Oberfläche gebunden. Als bevorzugtes Reagenz wurde Polybutadienyltriethoxysilan genannt. Danach wird das Monomer Vinylacetat über die Vinylfunktion mittels radikalischer Polymerisation an diese Schicht gebunden. Anschließend wird das kovalent an die Zwischenschicht gebundene Polyvinylacetat hydrolysiert und damit zu Polyvinylalkohol

umgesetzt.

Die von Shieh beschriebene Prozedur basiert auf einer langwierigen mehrstufigen Reaktion. Der erste Schritt basiert auf einer Silanolderivatisierung und ist daher stark abhängig von der Silanolgruppenkonzentration an der FS-Oberfläche und damit vom jeweiligen Herstellungsprozeß der Kapillare und/oder von der gewählten Vorbehandlung der Kapillare.

3) Das von Karger beschriebene Verfahren (US 5,840,388) ist dem von Shieh beschriebenen sehr ähnlich. Auch hier wird zunächst in organischen Solventien mittels Silanisierungsreaktion eine mit dem Monomer Vinylacetat reagierende Zwischenschicht über Si-O-Si-Bindungen aufgebracht, vorzugsweise mit Vinyltrimethoxysilan. Wie bei Shieh wird dann, in einer radikalischen Copolymerisationsreaktion der Zwischenschicht mit Vinylacetat, kovalent gebundenes Polyvinylacetat erzeugt. Nach Hydrolyse wird dann analog zu Shieh kovalent zur Quarzoberfläche gebundenes Polyvinylalkohol erhalten.

## Gegenstand der Erfindung

[0009] Zielsetzung der Erfindung war ein schnelles und zuverlässiges Verfahren zur Belegung von Kapillaren mit hydroxylicischen Polymeren, vorzugsweise mit Polyvinylalkohol, und deren Anwendung in elektromigrativen Trennverfahren.

[0010] Diese Zielsetzung einer permanenten Polymerbeschichtung einer Kapillare, vorzugsweise mit Polyvinylalkohol, wird erreicht, indem das gelöste Polymer während des Belegungsvorganges chemisch vernetzt und an der Kapillarwand immobilisiert wird. Dazu wird ein gelöstes bi- oder multifunktionelles Reagenz, vorzugsweise ein Dialdehyd, wie z.B. Glutaraldehyd, in die Kapillare überführt. Danach wird ein Pfropfen der Polymerlösung, vorzugsweise eine Polyhydroxiverbindung, wie z.B. Polyvinylalkohol, z. B. mit Hilfe eines unter Überdruck stehenden Gases, wie Stickstoff oder andere laborübliche Gase, z. B. Helium, Argon, Wasserstoff, oder mit Hilfe eines Quecksilberpfropfes durch die Kapillare gedrückt. Die zwischen der Polymerlösung und dem Vernetzer eintretende Reaktion ermöglicht eine gute Benetzung der Kapillarwand mit der Polymerlösung und immobilisiert gleichzeitig die entstehende Polymerschicht auf der Kapillarwand. Die so erzeugten sehr stabilen Polymerbeschichtungen sind sofort nach Trocknung durch weiteres Spülen mit Gas einsatzfähig und zeigen folgende Eigenschaften in der Kapillarelektrophorese: unterdrückter EOF sowohl im sauren und als auch im alkalischen pH-Bereich, sehr hohe Trenneffizienzen für adsorptive Analyten wie basische Proteine, Langzeitstabilität bei Verwendung wäßriger und nicht wäßriger Elektrolyte, Beständigkeit gegenüber stark sauren und alkalischen Spüllösungen, wie verdünnte

HCL- oder NaOH-Lösungen.

**[0011]** Mit diesem Verfahren ist es möglich sehr schnell und mit großer Zuverlässigkeit PVA beschichtete Kapillaren hoher Qualität herzustellen. Der Beschichtungsvorgang dauert wenige Minuten, das Trocknen der Kapillaren erfolgt im Stickstoffstrom über mehrere Stunden. Die Trocknungszeit kann durch Erhöhung der Temperatur signifikant verkürzt werden, so daß die Kapillaren in weniger als einer Stunde verfügbar sein können.

**[0012]** Kapillaren, die entsprechend unserem Verfahren mit PVA und Glutaraldehyd als Vernetzer belegt werden, sind im Vergleich zum analogen Verfahren ohne Vernetzer (mit ausschließlich thermischer Immobilisierung), wesentlich zuverlässiger herzustellen. In Abb. 1 sind die in CE-Trennungen erreichbaren Trenneffizienzen basischer Proteine für verschiedene nacheinander hergestellte Kapillaren dargestellt. Wird Glutaraldehyd als Vernetzer eingesetzt, so können in über 80 % der hergestellten Kapillaren sehr hohe Trenneffizienzen ( $N > 400.000$ ) für das stark basische Protein Cytochrom C erhalten werden.

Wird die Beschichtung jedoch ohne den Vernetzer durchgeführt, werden nur in 20 % der hergestellten Kapillaren Trenneffizienzen  $N$  größer 400.000 erhalten. Bei 30% Prozent der so hergestellten Kapillaren (Nr. 1, 5, 12, 15) kann für das stark adsorptive Protein kein Signal erhalten werden, es wurde wie an unbelegten Kapillaren irreversibel adsorbiert.

**[0013]** Mit unserem Verfahren lassen sich neben klassischen Kapillaren auch Oberflächen von Systemen mit mikrofluidischen Strukturen, wie z.B. von Mikrokanälen eines Kapillarelektrophorese Chips (CE-Chips) beschichten. Damit wird es möglich den elektroosmotischen Fluß in CE-Chips zu unterdrücken, sowie die Adsorption von Analyten wie z.B. Proteinen zu unterbinden. Durch gezielte Beschichtung einzelner Mikrokanäle eines komplexeren Systems, während andere unbeschichtet bleiben, lassen sich elektroosmotisch induzierte Flüssigkeitsströmungen in Netzwerken von Mikrokanälen gezielt manipulieren. So gelingt es für CE-Chips mit gekreuzten Mikrokanälen, nur den für die Trennung relevanten Hauptkanal zu beschichten und so die Analyse adsorptiver Proteine zu ermöglichen, während der Injektionskanal unbeschichtet bleibt und eine elektroosmotische Injektion in Richtung zur Kathode ermöglicht.

Unser Verfahren zur Herstellung polymerbeschichteter Kapillaren zeichnet sich durch folgende Eigenschaften aus:

- Da das Verfahren auf chemischer Vernetzung des Polymers beruht, eine chemische Bindung des Polymers an die Kapillarwand nicht erforderlich ist, kann es auf unterschiedlichste Kapillarmaterialien angewandt werden, wie z. B. Glas, „fused silica“, unterschiedliche Kunststoffe, wie Teflon, PEEK, Polyacrylate, und ist auch für unterschiedlich struk-

turierte Kanäle, wie z. B. klassische runde Kapillaren, (recht)-eckige Kanäle/Kapillaren und Mikrokanäle in mikrofluidischen Systemen (wie z.B. in CE-Chips) anwendbar.

- Das Verfahren ist einfach durchzuführen.
- Das Verfahren ist sehr schnell.
- Die erhaltenen Kapillaren lassen sich wiederholbar mit sehr hoher Qualität herstellen (geringer Ausschuß).

10

**[0014]** Die nach diesem Verfahren hergestellten beschichteten Kapillaren haben folgende Eigenschaften:

- Sie sind wiederholt für Trennungen einsetzbar.
- Sie erlauben CE-Trennungen stark adsorptiver Verbindungen wie Proteine sowohl in sauren, als auch neutralen und alkalischen Elektrolyten.
- Der Elektroosmotische Fluß ist über einen weiten pH-Bereich, mindestens von pH 2 bis pH 10, stark reduziert und von hoher Konstanz.
- Die chemisch immobilisierten PVA-Beschichtungen erweisen sich als stabil unter den Bedingungen der CE.
- Die Kapillaren sind insbesondere für folgende Anwendungen geeignet: CE-Trennungen basischer und azider Verbindungen, Kapillargelelektrophorese, isoelektrische Fokussierung, CE-Trennungen mit sehr geringen Ionenstärken des Elektrolyten und CE-Trennungen mit organischen Lösungsmitteln als Elektrolyte, wie zur Kopplung von Kapillarelektrophorese mit der Massenspektrometrie.
- Die erfindungsgemäß hergestellten Kapillaren und mikrofluidischen Systeme können u. a. zur Dosierung von zu analysierenden Proben z. B. in der Massenspektrometrie und für mikrosynthetische Verfahren in der Chemie eingesetzt werden.

35

Beispiel 1:

40

Belegung einer Kapillare mit PVA mit thermischer Nachbehandlung

45

**[0015]** Um eine für die Kapillarelektrophorese geeignete Trennsäule herzustellen, wurde für die nachfolgende Beschichtung eine handelsübliche „fused-silica“, Kapillare von 50 µm Innendurchmesser und 75 cm Länge (Hersteller: Poly-Micro, Phoenix, Arizona, USA) mit einer Beschichtungsapparatur verbunden. Anschließend wurde eine Glutaraldehydlösung (200 µL einer 50%igen wäßrigen Lösung mit 300 µL einer 1:10 verdünnten konz. HCl gemischt) mit 0,5 MPa Stickstoff für 5 Sekunden in die Säule gedrückt. Unmittelbar danach wurde eine PVA-Lösung (450 µL einer 5%igen wäßrigen PVA-Lösung mit 50 µL einer 1:1 mit H<sub>2</sub>O verdünnten HCl gemischt), (PVA: MW ca. 90 000, 99+% hydrolysiert, Aldrich) mit 0,5 MPa für 10 Sekunden in die Säule gedrückt. Beide Flüssigkeitspfropfen wurden

55

anschließend mit 0,5 MPa weiter durch die Säule transportiert. Nach 1-2 Minuten hatten sie die Säule verlassen und die entstandene Schicht wurde für 10 Minuten im Stickstoffstrom vorgetrocknet. Danach wurde zur beschleunigten Trocknung die Kapillare in einen heizbaren Ofen (Gaschromatographen) eingebaut und mit dem Injektor verbunden. Während man die Säule im Stickstoffstrom (0,15 - 0,20 MPa) spülte, wurde der Ofen von 40°C bis 160°C mit 6°C/min. aufgeheizt. Nach Abkühlen und Ausbau der Säule war sie für den Gebrauch fertig. Vor der Verwendung in einem CE-Gerät wurde an der entsprechenden Stelle durch Abschaben der äußeren Polyimidschicht ein UV-durchlässiges Fenster in der Kapillare erzeugt und diese durch Kürzen der Säule vorne und hinten um jeweils ca. 10 cm auf die gewünschte Länge gebracht.

**[0016]** In einer nach dem oben beschriebenen Verfahren hergestellten Kapillare der effektiven Länge: 40,5 cm der Gesamtlänge 54 cm und einem Innendurchmesser von 50 µm wurde eine Mischung folgender Proteine mehrfach analysiert: Cytochrom C, Lysozym Trypsinogen und α-Chymotrypsinogen. Die Trennung erfolgte in einem wäßrigen Phosphatpuffer der Konzentration 40 mMol L<sup>-1</sup> bei pH 3 und einer Spannung von 20 kV. In Abb. 2 sind die erste und die 91-te erhaltene Trennung übereinander geplottet. Es ist zu erkennen, daß mit diesen Kapillaren sehr gute, reproduzierbare Trennungen erhalten werden.

Beispiel 2:

PVA-Kapillaren ohne thermische Nachbehandlung

**[0017]** Zwei Kapillaren wurden analog zu Beispiel 1 mit PVA belegt, jedoch ohne nachfolgende thermische Behandlung. Es wurden 2 frisch gecoatete Kapillaren unterschiedlich lang im Stickstoffstrom getrocknet und die erhaltenen Kapillaren dann für den Einsatz in der Kapillarelektrophorese analog zu Beispiel 1 getestet. Die Testmischung bestand aus basischen Proteinen: (1) Cytochrom C, (2) Lysozym, (3) Trypsin, (4) Trypsinogen und (5) α-Chymotrypsinogen. Die erhaltenen Elektropherogramme und der Vergleich mit einer Trennung, die in einer unbelegten Kapillare erhalten wird ist in Abb. 3 dargestellt. In einer unbelegten Kapillare können wegen der starken Adsorption der Proteine keine effizienten Trennungen erhalten werden, das stark adsorptive Protein Cytochrom C wird sogar vollständig adsorbiert und eluiert nicht aus der Säule, siehe Abb. 3A. Mit einer nach unserem Verfahren hergestellten PVA-Kapillare werden hocheffiziente Signale aller Testverbindungen erhalten. Wird die Trocknung der PVA-Beschichtung im Gasstrom durchgeführt, so werden nach dem Trocknen der Beschichtung über 5 Stunden stabile und sehr effiziente Säulen erhalten. Wird nur für 10 Minuten im Gasstrom getrocknet, so sind die Trenneffizienzen N (in theoretischen Bodenzahlen) für stark adsorptive Verbindungen wie Cytochrom C geringer.

Beispiel 3:

Kapillarelektrophoretische Trennung basischer Dendrimere

**[0018]** Mit einer Analog zu Beispiel 1 hergestellten Kapillare wurden basische Dendrimere analysiert. Diese Verbindungen sind sehr adsorptiv gegenüber fused-silica. Mit einer unbelegten Kapillare kann wegen der Peakverbreiterung der adsorbierten Analyten daher nur eine schlechte CE-Trennung erhalten werden, siehe Abb. 4A. Wird die Trennung mit gleichen experimentellen Parametern aber mit einer PVA beschichteten Kapillare durchgeführt wird die Adsorption der Verbindungen an der Kapillarwand wirksam unterdrückt und es werden sehr scharfe Signale erhalten. Dies ist in Abb. 4B gezeigt.

**[0019]** PVA-Kapillaren können auch mit Elektrolyten betrieben werden, die sehr hohe Anteile organischer Lösungsmittel enthalten, dies ist insbesondere zur Kopplung der CE mit einem Massenspektrometer (MS) notwendig. Die CE Trennung von Dendrimern in einem zum MS kompatiblen Elektrolyten ist in Abb. 4C dargestellt.

Experimentelle Bedingungen:

**[0020]** Analytkonzentration: 1mg/ml, Spannung: 15 kV, Detektion: UV 200 nm, Elektrolyte: A,B: 40 mM L<sup>-1</sup> Na-Phosphat, C: 45% Methanol, 10 % Wasser, 45% Acetonitril, 20 mMol L<sup>-1</sup> Ammoniumacetat.

Beispiel 4:

Unterdrückung des EOF über einen weiten pH-Bereich

**[0021]** Mit einer analog zu Beispiel 1 hergestellten Kapillare wurde die Abhängigkeit des elektroosmotischen Flusses vom pH-Wert eines wäßrigen Elektrolyten bestimmt. Dazu wurden Na-Phosphatpuffer auf die entsprechenden pH-Werte titriert; der elektroosmotische Fluß wurde aus der Migrationszeit des neutralen Markers DMSO bestimmt. Die für eine PVA-Kapillare erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 5 mit den entsprechenden Ergebnissen für eine unbelegte Kapillare verglichen. In einer nach unserem Verfahren mit PVA belegten Kapillare ist der EOF über einen weiten pH-Bereich unterdrückt und ist, im Gegensatz zu unbelegten Kapillaren, nahezu unabhängig vom pH-Wert.

Beispiel 5:

Belegung der Mikrokanäle eines CE-Chips

**[0022]** Ein CE-Chip aus Borofloatglas mit mikrofluidischen Kanälen (20 µm Tiefe, 50 µm Breite, Länge des Injektionskanals 8 mm, Länge des Hauptkanals 85 mm) der Firma Micalyne (Edmonton, Kanada), wurde

gemäß unseres Verfahrens mit PVA belegt. Dazu wurde der Chip in einer Halterung mit Dichtungen plaziert und alle 4 Öffnungen mit jeweils einer Belegungsapparatur über Kapillaren gasdicht verbunden. Dies ist schematisch in Abbildung 6 gezeigt. Mit Hilfe der Belegungsapparaturen können Flüssigkeiten und Gase durch die mikrofluidischen Strukturen des Chips mittels Druck bewegt werden.

**[0023]** Zur Belegung aller Kanäle im Chip wurden zunächst die Kanäle im Chip vollständig, mit Wasser gefüllt. Danach wurde eine Glutaraldehydlösung (200 µL einer 50%igen wäßrigen Lösung mit 300 µl einer 1:10 verdünnten konz. HCl gemischt) mit 0,5 MPa Stickstoff über eine fused silica Kapillare (Innendurchmesser 50 µm, Länge 30 cm), in die Öffnung 1 des Mikrochips gedrückt, während die Kapillaren an Öffnung 2, 3 und 4 drucklos waren (siehe Abbildung 6). Unmittelbar danach wurde eine PVA-Lösung (450 µL einer 3%igen wäßrigen PVA-Lösung mit 50 µl einer 1:1 mit H<sub>2</sub>O verdünnten HCl gemischt), (PVA: MW ca. 90 000, 99+% hydrolysiert, Aldrich) mit 0,5 MPa für 10 Sekunden mittels der Kapillare in Öffnung 1 des Chips gedrückt. Beide Flüssigkeitspfropfen wurden anschließend mit 0,5 MPa weiter durch die Kanäle des Chips transportiert. Nach 1-2 Minuten hatten sie die mikrofluidischen Kanäle des Chips über die Öffnungen 2, 3 und 4 verlassen. Danach wurden die Öffnungen 2, 3 und 4 mit 0,5 MPa Stickstoffdruck beaufschlagt während an Öffnung 1 entspannt wurde um die Kanäle mit Gas zu spülen. Die entstandene Schicht an den Oberflächen der Kanäle wurde so für 15 Minuten im Stickstoffstrom vortrocknet. Danach wurde zur beschleunigten Trocknung der Chip zusammen mit der Halterung und den Kapillaren in einen heizbaren Ofen (Gaschromatographen) eingebaut und die Kapillare an Öffnung 1 mit dem Injektor verbunden. Während man die Kanäle im Stickstoffstrom (0,15 - 0,20 MPa) spülte, wurde der Ofen von 40°C bis 80°C mit 6°C/min. aufgeheizt. Nach Abkühlen und Ausbau des Chips war er für den Gebrauch fertig. CE-Chips mit so beschichteten Mikrokanälen zeichneten sich durch einen unterdrückten elektroosmotischen Fluß in beiden der gekreuzten Kanäle aus.

Beispiel 6:

Belegung ausgewählter Mikrokanäle eines CE-Chips

**[0024]** Nach unserem Verfahren in Kombination mit dem in Beispiel 5 beschriebenen experimentellen Aufbau lassen sich auch einzelne ausgewählte Kanäle von Systemen mit mikrofluidischen Strukturen beschichten. So gelingt es bei einem CE-chip mit zwei gekreuzten Kanälen nur einen mit PVA zu belegen, während der andere unbeschichtet bleibt und daher nur dort ein starker EOF präsent ist.

Zur alleinigen Belegung des Hauptkanals (Kanal zwischen Öffnung 1 und 3, siehe Abb. 6) in dem die elektrophoretische Trennung stattfindet, während der

kürzere Kanal für die Probenaufgabe unbelegt bleibt (Kanal zwischen Öffnung 2 und 4, siehe Abb. 6), wurde der Chip analog zu Beispiel 5 mit 4 Belegungsapparaturen verbunden und die Kanäle wurden vollständig mit Wasser gefüllt. Danach wurde eine Glutaraldehydlösung (200 µL einer 50%igen wäßrigen Lösung mit 300 µl einer 1:10 verdünnten konz. HCl gemischt) mit 0,5 MPa Stickstoff über eine fused silica Kapillare (Innendurchmesser 50 µm, Länge 30 cm), in die Öffnung 1 des Mikrochips gedrückt, während über die Kapillaren an Öffnung 2 und 4 Wasser mit einem Druck von 0,1 MPa zugeführt wurde, (siehe Abbildung 6). Nachdem die Glutaraldehydlösung an der Kapillare an Öffnung 3 austrat, wurde eine PVA-Lösung analog zu Beispiel 5, mit 0,5 MPa für 10 Sekunden über die Kapillare in Öffnung 1 des Chips gedrückt, während über Öffnung 2 und 4 wiederum mit Wasser gespült wurde. Der PVA-Flüssigkeitspfropfen wurde anschließend mit 0,5 MPa im Stickstoffstrom weiter durch den Hauptkanal des Chips transportiert. Nach 1-2 Minuten hatte er den Hauptkanal des Chips über die Kapillare an Öffnung 3 verlassen. Danach wurden die Öffnungen 2, 3, 4 mit 0,5 MPa Stickstoffdruck beaufschlagt während an Öffnung 1 entspannt wurde um die Kanäle mit Gas zu spülen. Die entstandene Schicht an den Oberflächen wurden danach wie in Beispiel 5 getrocknet.

**[0025]** CE-Chips mit einem so beschichteten Hauptkanal zeichneten sich dort durch einen unterdrückten elektroosmotischen Fluß aus, während ein starker kathodischer Fluß im Probenaufgabekanal vorhanden war.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Belegung der inneren Oberfläche von Kapillaren oder Röhren mit einer hydrophilen Polymerschicht, dadurch gekennzeichnet, daß ein gelöstes hydroxylishes Polymer durch chemische Vernetzung mit einem quervernetzenden Reagenz an der Kapillarwand immobilisiert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die eine Kapillare teilweise oder vollständig füllende Lösung des quervernetzenden Reagenzes mit einem Pfropfen des gelösten Polymers aus der Kapillare verdrängt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei Reagenzlösung und Polymerlösung mittels Überdruck durch ein inertes Gas aus der Kapillare verdrängt werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1-3, wobei die entstandene hydrophile Polymerschicht im Gasstrom getrocknet wird.
5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die Kapillare zum beschleunigten Trocknen im Gasstrom erhitzt wird.

6. Verfahren nach Anspruch 3-5, wobei als Gas Stickstoff, Helium, Argon oder Wasserstoff eingesetzt wird.
7. Verfahren nach Anspruch 1-6 wobei als quervernetzendes Reagenz eine Verbindung mit ein oder mehreren Carbonylgruppen in Form von Ketonen oder Aldehyden eingesetzt werden. 5
8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei als quervernetzendes Reagenz ein Dialdehyd eingesetzt wird. 10
9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei als Dialdehyd Glutaraldehyd eingesetzt wird. 15
10. Verfahren nach Ansprüchen 1-9, wobei als Polymer eine Polyhydroxyverbindung eingesetzt wird. 20
11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei als Polyhydroxyverbindung Polyvinylalkohol eingesetzt wird. 25
12. Verfahren nach Ansprüchen 1-11, wobei die Kapillaren oder Röhren Bestandteile mikrofluidischer Strukturen sind. 30
13. Kapillaren, deren innere Oberflächen nach einem Verfahren der Ansprüche 1-12 mit einer hydrophilen Polymerschicht belegt sind. 35
14. Kapillaren nach Anspruch 13, die mit Polyvinylalkohol beschichtet sind. 40
15. Systeme mit mikrofluidischen Strukturen, dadurch gekennzeichnet, daß einzelne oder alle darin enthaltenen Mikrokanäle oder Kapillaren gemäß einem Verfahren nach Anspruch 1-12 mit einer hydrophilen Polymerschicht belegt sind. 45
16. Anwendung der Kapillaren oder Systeme gemäß Ansprüchen 13 bis 15 in elektromigrativen Trennverfahren und anderen Techniken unter Verwendung mikrofluidischer Systeme. 50
17. Anwendung der Kapillaren oder Systeme gemäß Ansprüchen 13-15 zur Dosierung flüssiger Proben z.B. für die chemische Analyse oder für mikrosynthetische Verfahren in der Chemie. 55

50

55

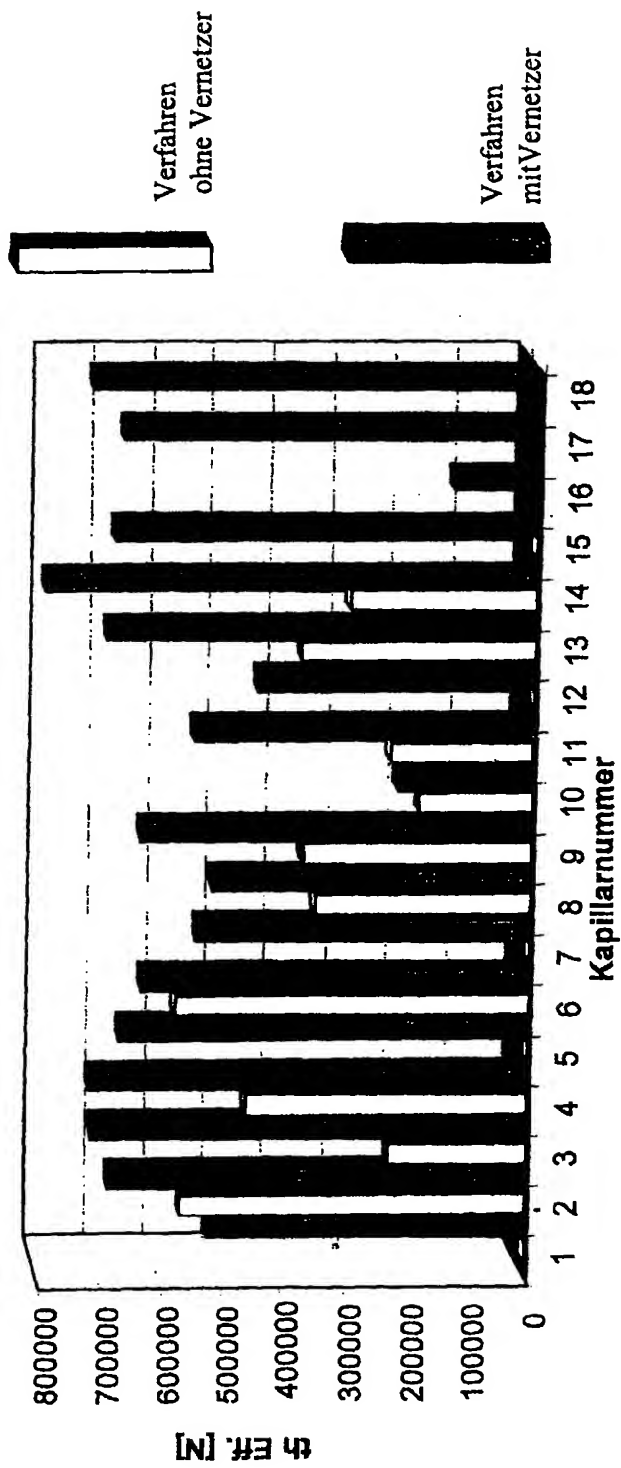


Abb. 1 Vergleich der Qualität aufeinanderfolgender Kapillarbeschichtungen nach dem Beschichtungsverfahren mit Vernetzer und einem analogen Verfahren ohne Vernetzer.  
In CE-Trennungen erhaltene Effizienzen für Cytochrom C.



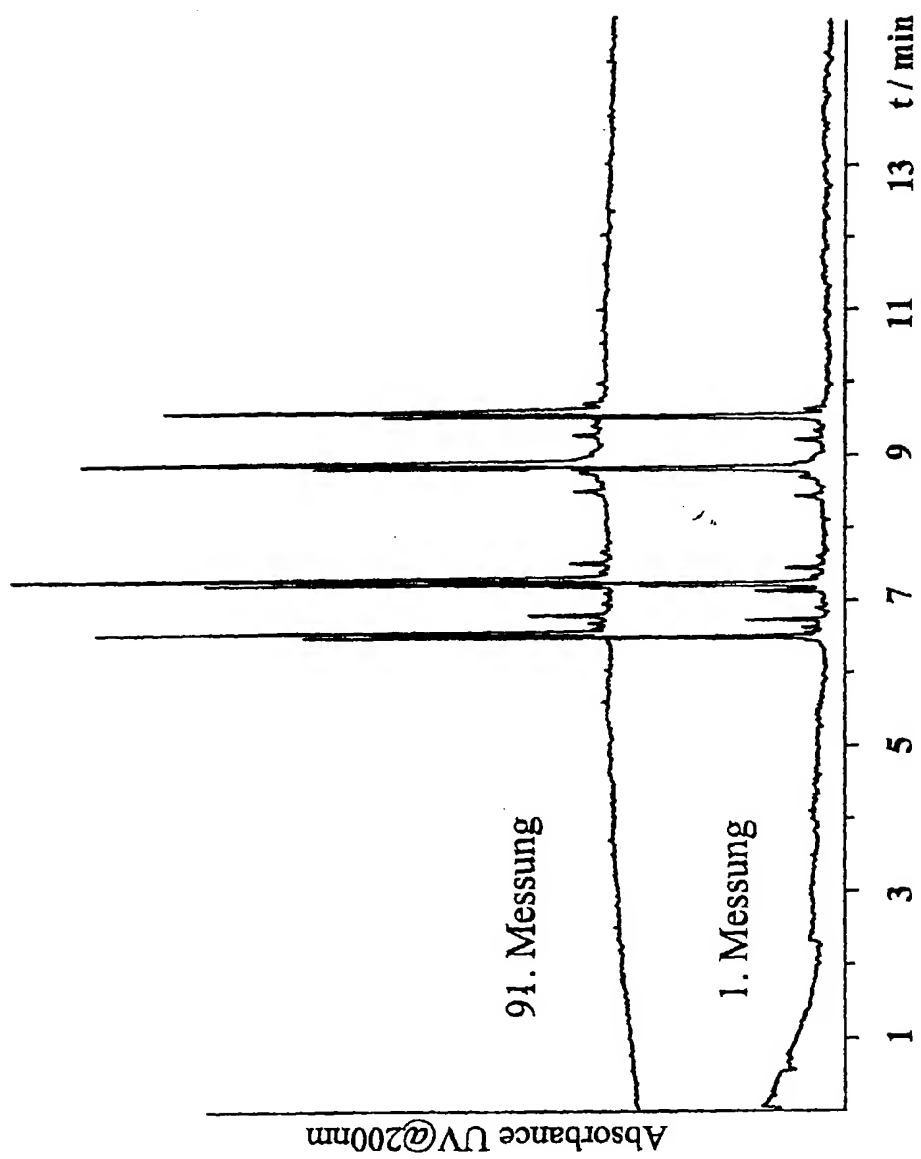


Abb. 2 Reproduzierbarkeit von CE-Trennungen basischer Proteine in einer mit PVA beschichteten Kapillare

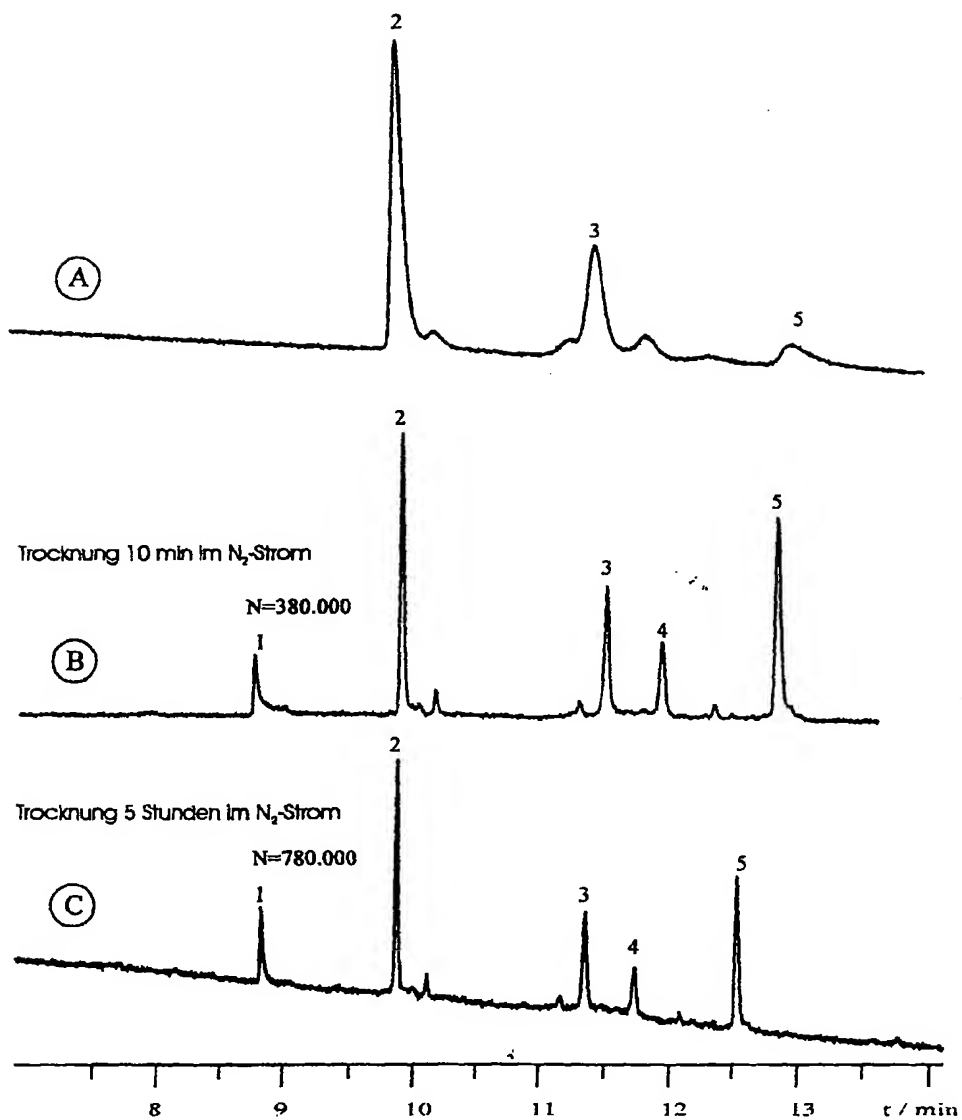


Abb. 3 Vergleich von CE-Trennungen basischer Proteine mit unterschiedlich lang getrockneten PVA-Kapillaren (B;C) und mit einer unbelegten Kapillare (A)

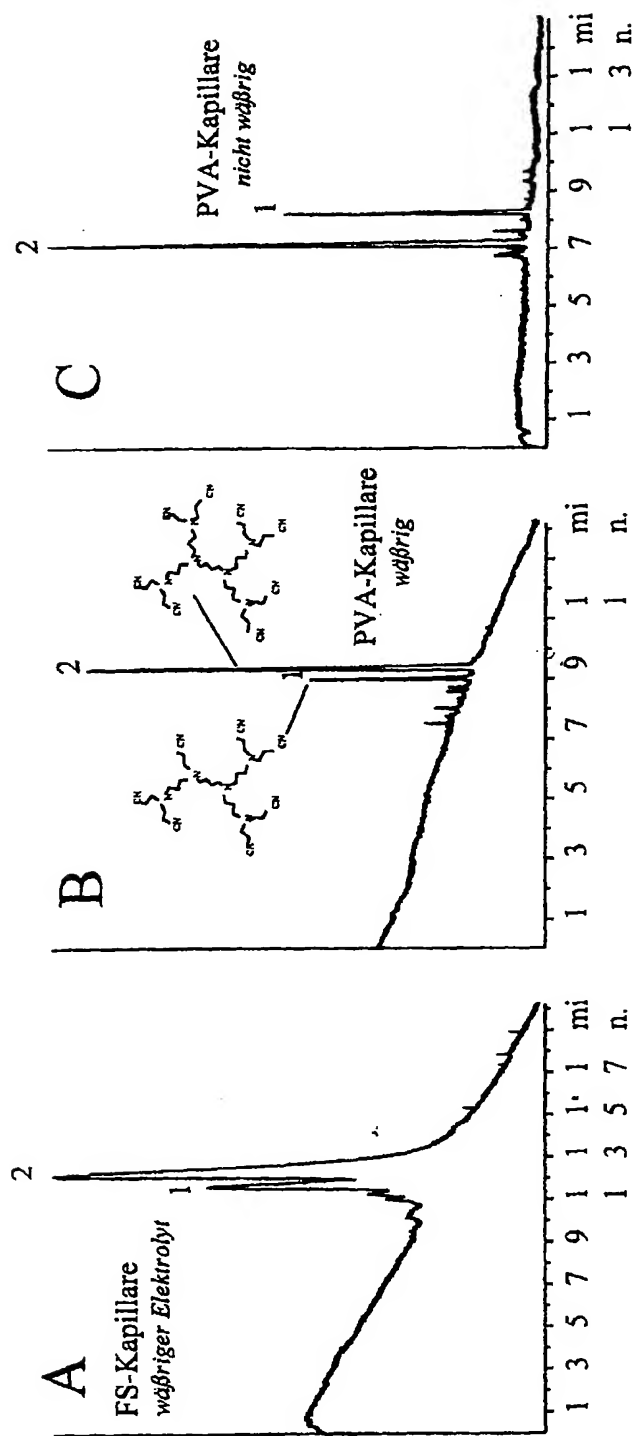


Abb. 4 Einsatz einer PVA-Kapillare zur CE-Analyse basischer Dendrimere in einem wäßrigen (B) und einem nicht wäßrigen Elektrolyten (C) und der Vergleich zu einer CE-Trennung mit unbelegter Kapillare (A)

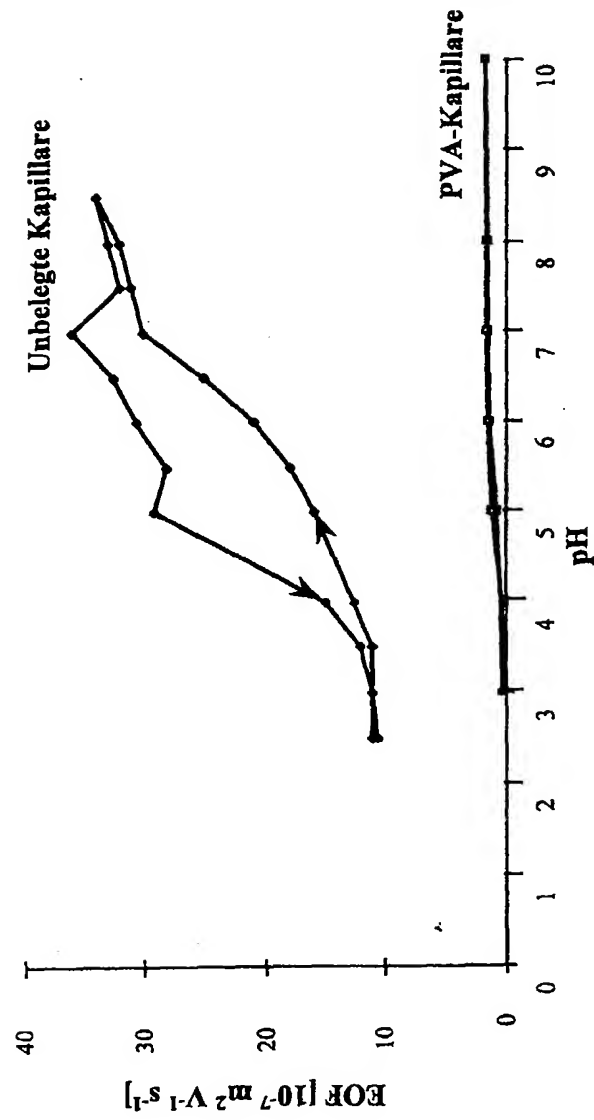


Abb. 5 Einfluß des Elektrolyt pH-Wertes auf den elektroosmotischen Fluß einer PVA-Kapillaren verglichen mit einer unbelegten Kapillare

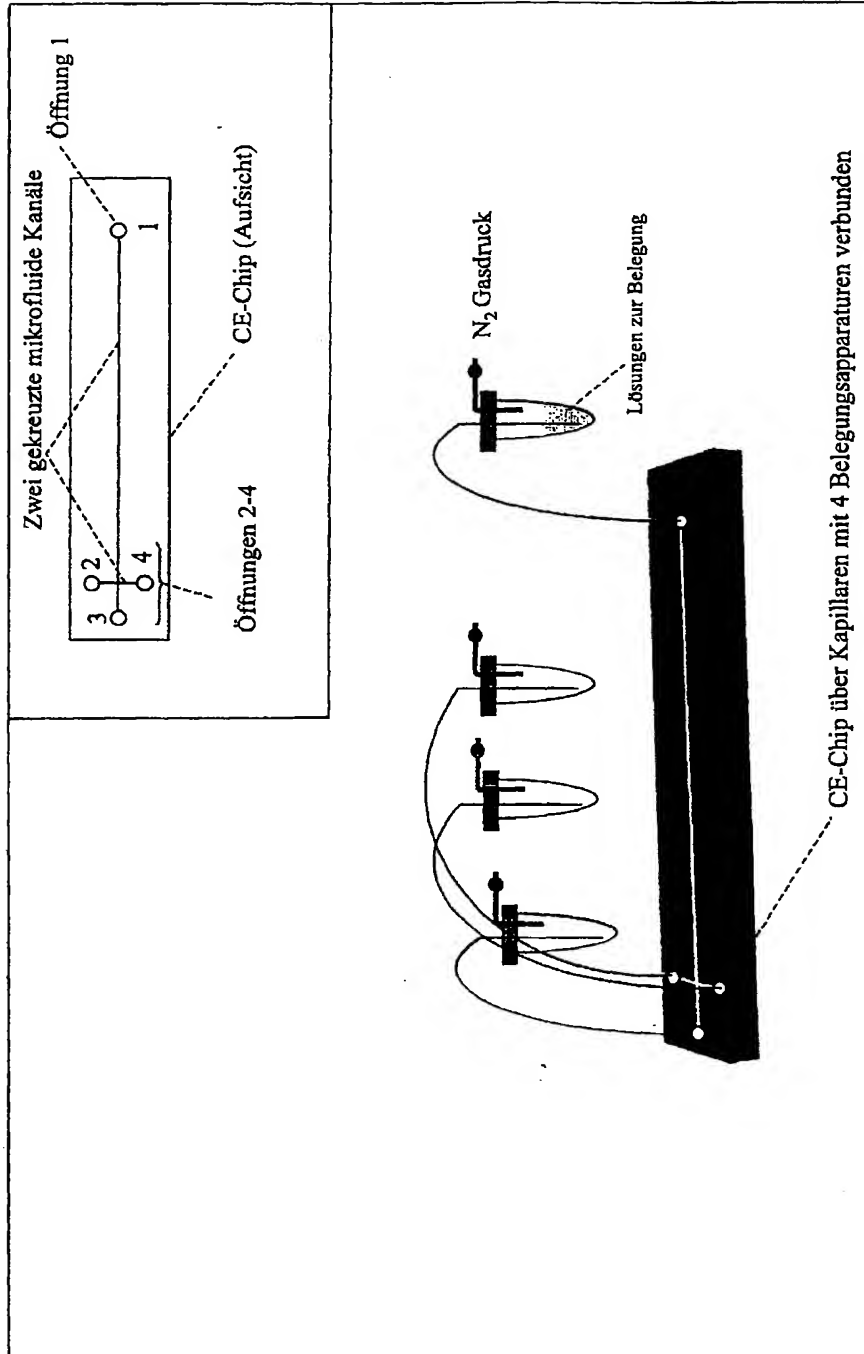
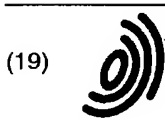


Abb. 6 Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus zur Beschichtung von Mikrokanälen in CE-Chips



(19)

Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

**EP 1 076 239 A3**

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(88) Veröffentlichungstag A3:  
30.05.2001 Patentblatt 2001/22

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: **G01N 27/447**

(43) Veröffentlichungstag A2:  
14.02.2001 Patentblatt 2001/07

(21) Anmeldenummer: 00116757.6

(22) Anmeldetag: 03.08.2000

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU  
MC NL PT SE**  
Benannte Erstreckungsstaaten:  
**AL LT LV MK RO SI**

(30) Priorität: 11.08.1999 DE 19938002

(71) Anmelder:  
**Studiengesellschaft Kohle mbH  
45470 Mülheim an der Ruhr (DE)**

(72) Erfinder:  
• **Belder, Detlev, Dr.**  
**45470 Mülheim/Ruhr (DE)**  
• **Husmann, Heribert**  
**45470 Mülheim/Ruhr (DE)**

(74) Vertreter:  
**von Kreisler, Alek, Dipl.-Chem. et al**  
**Patentanwälte,**  
**von Kreisler-Selting-Werner,**  
**Bahnhofsvorplatz 1 (Deichmannhaus)**  
**50667 Köln (DE)**

(54) **Beschichtung mit quervernetzten hydrophilen Polymeren**

(57) Gegenstand der Erfindung sind ein Verfahren zur permanenten Beschichtung der inneren Oberfläche von Säulen, Kapillaren und Mikrokanalsystemen mit hydroxylyischen Polymeren, wie z.B. Polyvinylalkohol, sowie die so hergestellten Säulen, Kapillaren und Mikrokanalsysteme und deren Anwendung in der Kapillarelektrophorese und für andere Techniken unter Verwendung mikrofluidischer Systeme.

EP 1 076 239 A3



Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung  
EP 00 11 6757

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
A	WO 96 23221 A (BECKMAN INSTRUMENTS INC ;UNIV NORTHEASTERN (US); KARGER BARRY L (U) 1. August 1996 (1996-08-01) * Zusammenfassung *	1, 13, 15-17	G01N27/447
A	US 4 796 700 A (SANDIFORD BURTON B ET AL) 10. Januar 1989 (1989-01-10) * Zusammenfassung *	1	
A	WO 99 20378 A (KIM KWANG JOO ;KIM BEOM SIK (KR); KIM CHUL UNG (KR); LEE JUNG MIN) 29. April 1999 (1999-04-29) * Seite 6, Zeile 18 - Seite 7, Zeile 5 * * Seite 13, Zeile 2 - Zeile 10 *	1	
A	US 5 322 608 A (KARGER BARRY L ET AL) 21. Juni 1994 (1994-06-21) * Zusammenfassung *	1	
A	EP 0 587 156 A (STUDIENGESELLSCHAFT KOHLE MBH) 16. März 1994 (1994-03-16) * Ansprüche 1-4 *	1	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7)
			G01N
Recherchenort		Abschlußdatum der Recherche	
DEN HAAG		9. April 2001	
Prüfer		Duchatellier, M	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

EPO FORM 1503 03.92 (P04C03)

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT  
 ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 00 11 6757

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am

Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

09-04-2001

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9623221 A	01-08-1996	US 5605613 A	25-02-1997
		EP 0753144 A	15-01-1997
		JP 10505166 T	19-05-1998
US 4796700 A	10-01-1989	AT 122708 T	15-06-1995
		CA 1254337 A	16-05-1989
		DE 3588019 D	22-06-1995
		EP 0186663 A	09-07-1986
		GB 2145420 A, B	27-03-1985
		NO 178903 B	18-03-1996
		WO 8600330 A	16-01-1986
WO 9920378 A	29-04-1999	KR 217311 B	01-09-1999
		EP 1024886 A	09-08-2000
US 5322608 A	21-06-1994	AU 5874194 A	19-07-1994
		EP 0627079 A	07-12-1994
		JP 7507876 T	31-08-1995
		WO 9415209 A	07-07-1994
EP 0587156 A	16-03-1994	DE 4230403 A	17-03-1994
		AT 155704 T	15-08-1997
		CA 2105821 A, C	12-03-1994
		DE 69312407 D	28-08-1997
		DE 69312407 T	26-02-1998
		JP 6186202 A	08-07-1994
		US 5502169 A	26-03-1996

EPO FORM P0481

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82